

## 5. Zusammenfassung

Andreas Thum

Wirkung verschiedener Sekretagoga (Hormone, Neurotransmitter und Pharmaka) auf die intrazelluläre Calciumkonzentration in isolierten Colonkrypten von Meerschweinchen und Menschen

\*\*\*

Die freie intrazelluläre Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) stellt ein wichtiges Second-messenger-System der Regulierung des Elektrolyt- und Wassertransportes im Colon der Säugetiere dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß verschiedener Sekretagoga auf die  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Colonkrypten aus dem distalen Colon des Meerschweinchens und dem Colon sigmoideum des Menschen untersucht.

Die Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  erfolgte mittels des calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 an einem inversen Mikroskop. Die Fluoreszenz wurde mit einem digitalen Bildverarbeitungssystem erfaßt und in die  $[Ca^{2+}]_i$  umgerechnet.

Der cholinerge Agonist Carbachol und das biogene Amin Histamin führten in den isolierten Krypten von Meerschweinchen und Mensch zu einer biphasischen  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung mit einem schnellen transienten Peak und einem leichten Abfallen auf eine Plateauphase mit erhöht bleibender  $[Ca^{2+}]_i$ . Erst nach Entfernen der stimulierenden Substanz ging die  $[Ca^{2+}]_i$  wieder auf den Basiswert zurück.

Die erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  in der Plateauphase war bei Messungen in nominell calciumfreier Lösung nicht mehr vorhanden.

Die Effekte von Carbachol und Histamin addierten sich bei gemeinsamer Gabe. Dies spricht für die Aktivierung unterschiedlicher Rezeptoren (Carbachol: muscarinerge Acetylcholinrezeptoren; Histamin:  $H_1$ -Rezeptoren).

Die Carbachol-Wirkung war dosisabhängig mit einer halbmaximalen Wirkstoffkonstante von  $1,5 \cdot 10^{-5}$  M für die Meerschweinchenkrypten und  $5,0 \cdot 10^{-5}$  M für die humanen Krypten.

Aufgrund von Blockaden der muscarinergen Rezeptoren mit Atropin (halbmaximale Hemmstoffkonstante:  $2,9 \cdot 10^{-10}$  M), der mikrosomalen  $Ca^{2+}$ -ATPase mit Thapsigargin sowie der mikrosomalen und basolateralen Calciumkanäle mit TMB-8 bzw. Verapamil konnte ein

Modell für die Signaltransduktion der Carbachol-Wirkung an den Kryptenzellen des Meerschweinchens aufgestellt werden. Danach aktiviert die Kopplung von Carbachol an muscarinerge Rezeptoren die mittels G-Protein gebundene Phospholipase C, welche Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphat zu Diacylglycerol und Inositol 1, 4, 5-trisphosphat spaltet. Letzteres löst an den intrazellulären Calciumspeichern eine Öffnung der Calciumkanäle aus. Dies führt zu einem schnellen transienten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Die so erhöhte  $[Ca^{2+}]_i$  bewirkt in Kombination mit einem noch nicht bekannten Folgeprodukt der Inositol 1, 4, 5-trisphosphat-Produktion die Öffnung der basolateralen Calciumkanäle mit dem darauffolgenden Einstrom von Calcium aus dem Extrazellularraum während der Plateauphase.

Die Tachykinine Substanz P und Neurokinin A führten nur zu einer vorübergehenden Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$ . Aufgrund dieses von den Carbachol- und Histamin-Effekten verschiedenen Verlaufs der Reaktion ist nicht von einer Aktivierung von muscarinergen oder  $H_1$ -Rezeptoren auszugehen. Die Wirkung von Substanz P war stärker als die von Neurokinin A.

Aufgrund von Messungen an der menschlichen Colontumorzelllinie HT<sub>29</sub> war bisher eine calciumvermittelte Neurotensinwirkung angenommen worden. Die starke Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  in diesen Zellen wurde bestätigt. Die isolierten Colonekrypten von Meerschweinchen und Menschen zeigten jedoch keine Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  nach Gabe von Neurotensin.

Nach der Gabe von Prostaglandin E<sub>2</sub> bzw. Vasoaktivem Intestinalen Polypeptid ergab sich eine geringe transiente  $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung in den Krypten, deren Bedeutung nicht geklärt werden konnte.

Adrenalin, Forskolin und Bradykinin bewirkten keine Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  in den isolierten Colonekrypten.

Die Reaktionen der isolierten Colonekrypten von Meerschweinchen und Menschen zeigten keine qualitativen und nur geringe quantitative Unterschiede der Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  nach Stimulation mit verschiedenen Sekretagoga.

Es ergibt sich daher aus der vorliegenden Arbeit, daß die Messung der  $[Ca^{2+}]_i$  in isolierten Krypten aus dem distalen Colon des Meerschweinchens eine gute qualitative Methode zur Voruntersuchung der Wirkungsweise verschiedener Sekretagoga auch in bezug auf das Colon sigmoideum des Menschen darstellt. Die genauere Quantifizierung kann dann mit menschlichen Krypten vorgenommen werden, die nicht in so großer Menge zur Verfügung stehen.

## 6. Summary

Andreas Thum

Effects of different secretagogues (hormones, neurotransmitters and pharmacological substances) on the intracellular calcium concentration in isolated colonic crypts of guinea pig and men

\*\*\*

The cytosolic calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) is an important second-messenger-system for the regulation of electrolyte and fluid transport in the mammalian colon.

In this study, the influence of different secretagogues on the  $[Ca^{2+}]_i$  was tested in isolated crypts of the distal colon of guinea pig and of the human sigmoid colon.

The experiments were performed by measuring the fluorescence of the calcium-indicator fura-2 using an inverted microscope and a digital-video-imaging system.

The cholinergic agonist carbachol and the biogenic amine histamine increased the  $[Ca^{2+}]_i$  in isolated crypts of guinea pig and men in a biphasic manner with a rapid initial peak and a sustained plateau on a lower level. The plateau persisted as long as the stimulating substance was present and returned to basal levels after wash-out of the stimulating substance. The increase in  $[Ca^{2+}]_i$  in the plateau phase was not present when measured in nominally calcium-free solution. The effects of carbachol and histamine were additive. This is indicative of an activation of different receptors (carbachol: muscarinic acetylcholine receptors; histamine:  $H_1$ -receptors). Carbachol increased  $[Ca^{2+}]_i$  dose dependently with a half maximal effective concentration of  $1.5 \cdot 10^{-5}$  M in guinea pig and  $5.0 \cdot 10^{-5}$  M in human crypts.

Changes of  $[Ca^{2+}]_i$  were observed during blockage of muscarinic receptors with atropine (half maximal effective concentration:  $2.9 \cdot 10^{-10}$  M), the microsomal  $Ca^{2+}$ -ATPase during addition of thapsigargin and in the presence of the microsomal or basolateral calcium channel inhibitors TMB-8 and verapamil respectively. This led to the proposal of the following model of signal transduction of the carbachol response in crypt cells of guinea pig. Coupling of carbachol to the muscarinic receptors activates the G-protein bound phospholipase C, which metabolizes phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate to diacylglycerol and inositol 1, 4, 5-trisphosphate. Release of calcium from intracellular stores, induced by rising inositol 1, 4, 5-trisphosphate levels, caused a rapid and transient calcium peak. The increased  $[Ca^{2+}]_i$ , together with an unknown product of inositol 1, 4, 5-trisphosphate-mobilization, evokes an influx of calcium across the plasma membrane.

Both tested tachykinins, substance P and neurokinin A, evoked only a transient rise in  $[Ca^{2+}]_i$ . This difference in response to carbachol or histamine and the tachykinin-mediated effect suggests that neither muscarinic nor  $H_1$ -receptors are activated. The neurokinin A response was less than that produced by substance P.

Results of previous studies with the human tumor cell line HT<sub>29</sub> suggest a calcium mediated response to neurotensin. The high increase in  $[Ca^{2+}]_i$  seen in these cells could be verified. In contrast, there was no effect of neurotensin on  $[Ca^{2+}]_i$  in isolated human or guinea pig colonic crypts respectively.

After addition of prostaglandin E<sub>2</sub> or vasoactive intestinal polypeptide to the isolated crypts a slight transient increase in  $[Ca^{2+}]_i$  occurred. Based on current knowledge, this observation cannot be explained.

Neither epinephrine, forskolin nor bradykinin evoked an increase in  $[Ca^{2+}]_i$ .

Qualitative response to tested secretagogues in guinea pig crypts was found to be similar to that of isolated crypts from human sigmoid colon. Only few quantitative differences between isolated human and guinea pig colonic crypts were detected after stimulation with different secretagogues.

The present study characterizes the measurement of  $[Ca^{2+}]_i$  in isolated crypts of the distal guinea pig colon as a good qualitative tool to investigate the mechanisms of the response to secretagogues. The quantification of the secretagogue mediated effects could then be performed using the human crypts, which are only available in limited quantities.